

ภาคผนวก



ภาคผนวก ก

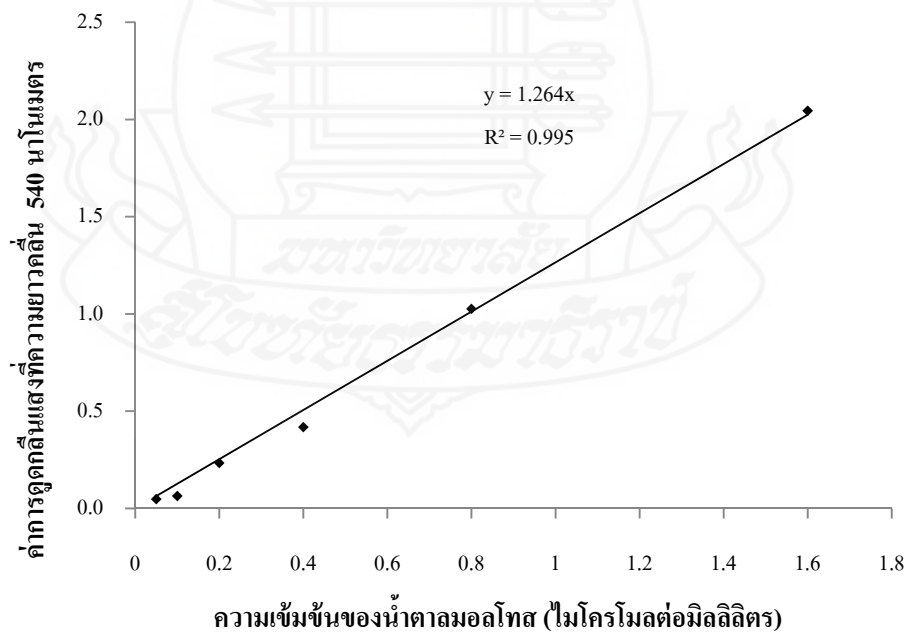
การเตรียมกราฟมาตรฐาน



1. การเตรียมกราฟมาตรฐานน้ำตาลมอลโทสสำหรับศึกษาประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตในหลอดทดลอง

วิธีการ

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลมอลโทสความเข้มข้น 1.6 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร
2. เจือจางสารละลายมาตรฐานน้ำตาลมอลโทสให้ได้ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 และ 0.8 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร
3. ปิเปตสารละลายมาตรฐานน้ำตาลมอลโทสแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง
4. เติมสารละลายกรดไคไนโตรซาลิไซลิกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน
5. นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น
6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
7. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโทส (ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

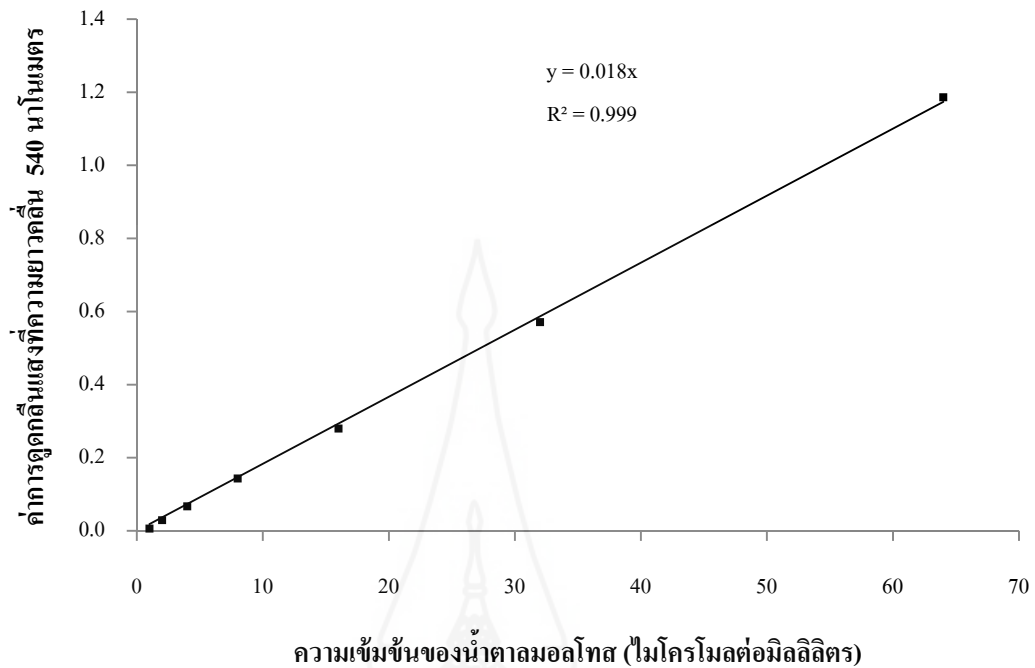


ภาพผนวกที่ ก1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโทสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

2. การเตรียมกราฟมาตรฐานน้ำตาลมอลโทสสำหรับศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

วิธีการ

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลมอลโทสความเข้มข้น 64 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร
2. เจือจางสารละลายมาตรฐานน้ำตาลมอลโทสให้ได้ความเข้มข้น 1, 2, 4, 8, 16 และ 32 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร
3. ปิเปตสารละลายมาตรฐานน้ำตาลมอลโทสแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 25 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง
4. เติม 0.2 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8 ปริมาตร 62.5 ไมโครลิตร
5. เติม 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 37.5 ไมโครลิตร
6. เติม Tris-HCl ปริมาตร 125 ไมโครลิตร แล้วผสมเข้าด้วยกัน
7. เติมสารละลายกรดไคนโตรซาลิไซลิก ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน
8. นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
9. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
10. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร
11. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโทส (ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร



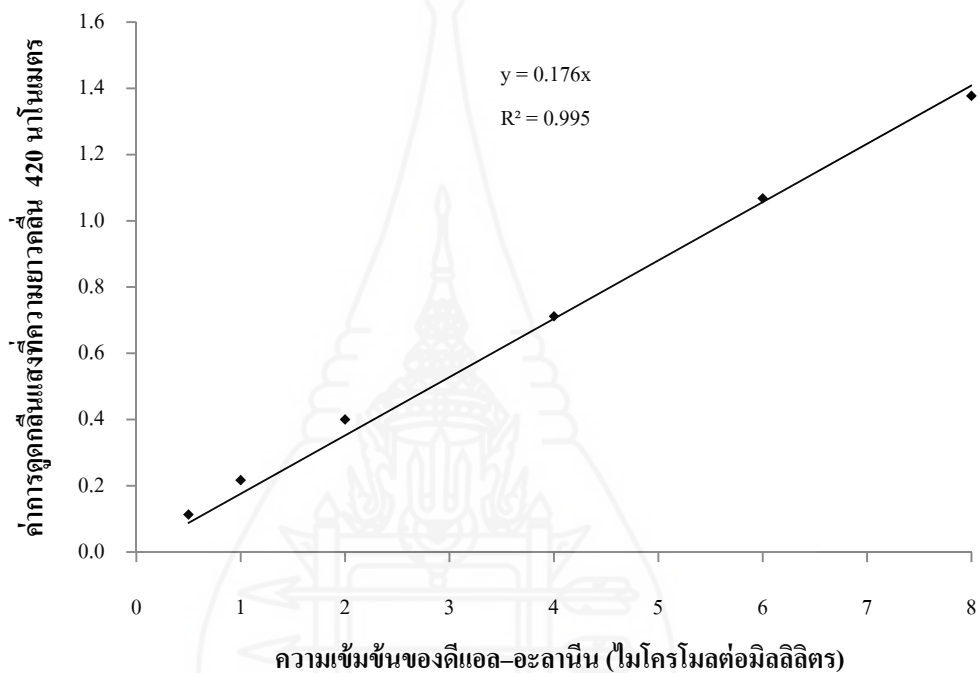
ภาพผนวกที่ ก2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโทสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

3. การเตรียมกราฟมาตรฐานของดีแอล-อะลานีน (DL-Alanine) สำหรับศึกษาประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในหลอดทดลอง

วิธีการ

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานดีแอล-อะลานีนความเข้มข้น 8 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร
2. เจือจางสารละลายมาตรฐานดีแอล-อะลานีนให้ได้ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 4 และ 6 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร
3. ปิเปตสารละลายมาตรฐานดีแอล-อะลานีนแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง
4. เติม 50 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
5. เติม 0.1 เปอร์เซ็นต์ กรดพิคริซัลโฟนิค ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน
6. นำไปบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

7. เติม 1 โมลาร์ กรดไฮโดรคลอริก ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วผสมเข้ากัน ปล่อยให้เย็นลง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดแสงที่ 420 นาโนเมตร
8. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของดีแอล-อะลานีน (ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร



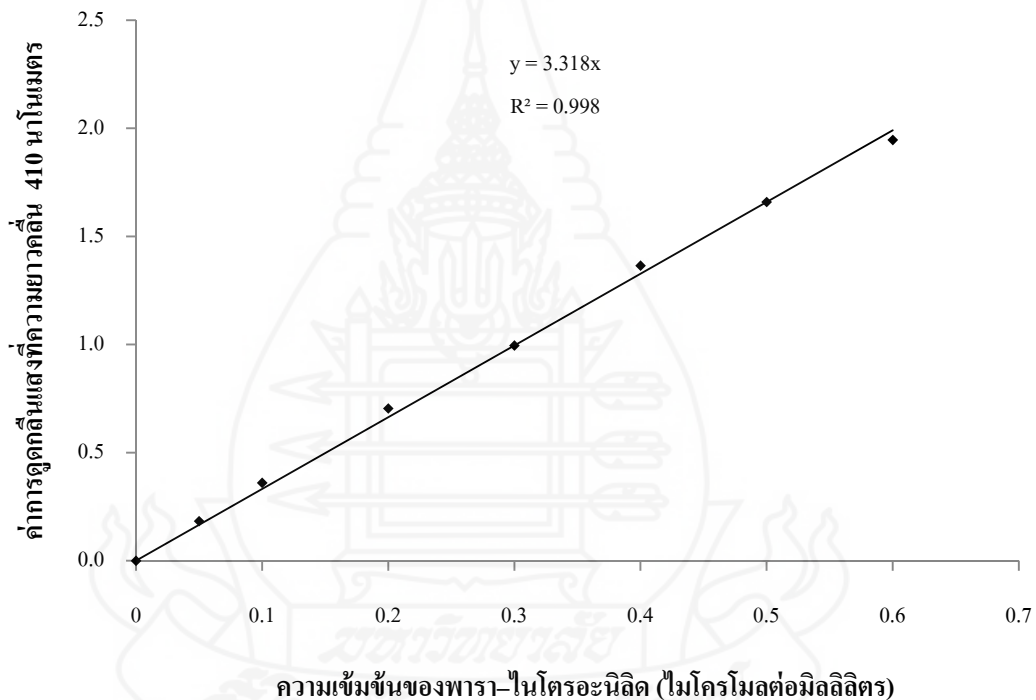
ภาพผนวกที่ ก3 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของดีแอล-อะลานีนกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร

4. การเตรียมกราฟมาตรฐานของพารา-ไนโตรอะนิลิด (*p*-Nitroanilide) สำหรับศึกษาปฏิกิริยาของทริปซิน

วิธีการ

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานพารา-ไนโตรอะนิลิด ความเข้มข้น 0.6 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร
2. เจือจางสารละลายมาตรฐานพารา-ไนโตรอะนิลิด ให้ได้ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร

3. ปิเปตสารละลายมาตรฐานพารา-ไนโตรอะนิลีน แต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง
4. เติม 0.2 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน
5. เติม 30 เปอร์เซนต์ กรดอะซิติก ปริมาตร 400 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน
6. ตั้งทิ้งไว้ 5 นาทีแล้วนำไปวัดค่าการดูดแสงที่ 410 นาโนเมตร
7. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของพารา-ไนโตรอะนิลีน (ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร



ภาพผนวกที่ ก4 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของพารา-ไนโตรอะนิลีน
กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร

ภาคผนวก ข

ภาพกิจกรรมการทดลอง



การเตรียมตัวอย่างกากมะพร้าว



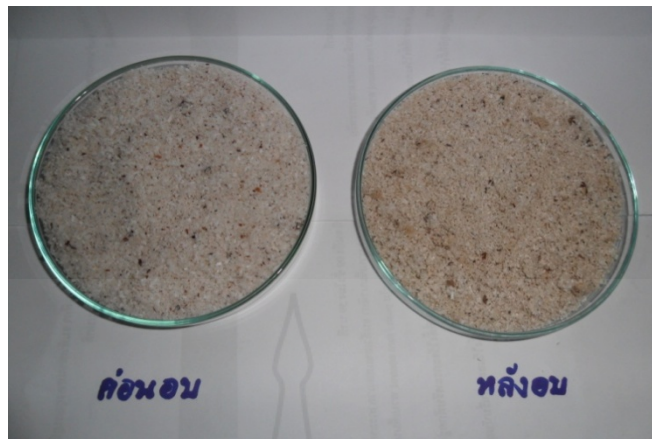
ภาพผนวกที่ ข1 การผสมกากมะพร้าวที่สุมเก็บตัวอย่างมาให้เป็นเนื้อเดียวกัน



ภาพผนวกที่ ข2 การเตรียมตัวอย่างกากมะพร้าวก่อนอบ



ภาพผนวกที่ ข3 การนำกากมะพร้าวไปอบเพื่อกำจัดความชื้น



ภาพผนวกที่ ข4 การเตรียมตัวอย่างกากมะพร้าวก่อนและหลังอบ



ภาพผนวกที่ ข5 กากมะพร้าวชุดควบคุมและกากมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปรโดยใช้วิธีการที่แตกต่างกัน

การเก็บตัวอย่างปลาเพื่อสกัดเอนไซม์



ภาพผนวกที่ ข6 ตัวอย่างปลาตะเพียน



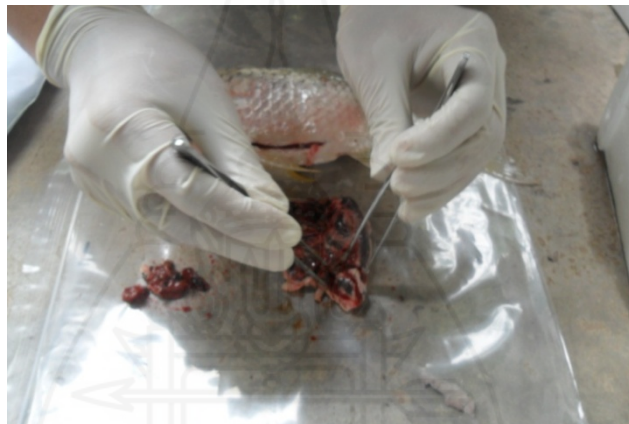
ภาพผนวกที่ ข7 ตัวอย่างปลานิล



ภาพผนวกที่ ข8 ตัวอย่างปลาช่อน



ภาพผนวกที่ ข9 การผ่าตัดแยกส่วนอวัยวะภายในออกจากตัวปลา



ภาพผนวกที่ ข10 การแยกส่วนของไขมันและอวัยวะอื่นๆ ออกจากลำไส้



ภาพผนวกที่ ข11 การผ่าตัดแยกอวัยวะภายในบนน้ำแข็งเพื่อรักษาสภาพของเอ็นไซม์

การสกัดเอนไซม์จากลำไส้ปลา



ภาพผนวกที่ ข12 การผสมบัพเฟอร์กับลำไส้ปลา ก่อนการสกัดเอนไซม์



ภาพผนวกที่ ข13 เอนไซม์ที่สกัดจากลำไส้ปลาทั้ง 3 ชนิด



ภาพผนวกที่ ข14 การนำตัวอย่างไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส และทริปซิน



ภาพผนวกที่ ข15 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส



ภาพผนวกที่ ข16 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน

ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยในหลอดทดลอง



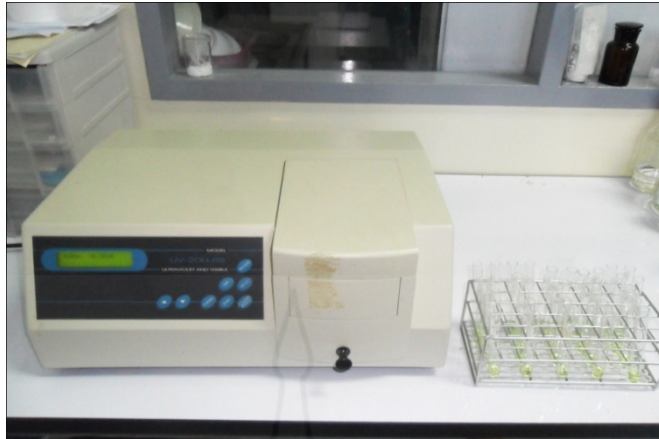
ภาพผนวกที่ ข17 เครื่องเขย่าตัวอย่าง



ภาพผนวกที่ ข18 การบ่มตัวอย่าง



ภาพผนวกที่ ข19 การตรวจสอบประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน



ภาพผนวกที่ ข20 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง



การศึกษาโครงสร้างระดับจุลภาค



ภาพผนวกที่ ข21 การเตรียมตัวอย่าง



ภาพผนวกที่ ข22 การบรรจุตัวอย่างในกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด



ภาพผนวกที่ ข23 การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

การศึกษาการกระจายรังสีเอกซ์



ภาพผนวกที่ ข24 ถ้วยบดตัวอย่าง



ภาพผนวกที่ ข25 เครื่องบดตัวอย่าง (Mixer Mill)



ภาพผนวกที่ ข26 การเตรียมตัวอย่าง



ภาพผนวกที่ ข27 เครื่องเอกซเรย์ดิฟแฟรคโตมิเตอร์



ภาพผนวกที่ ข28 ระบบคอมพิวเตอร์ควบคุมเครื่องเอกซเรย์ดิฟแฟรคโตมิเตอร์

การศึกษาสมบัติทางความร้อน



ภาพผนวกที่ ข29 ถาดบรรจุสารตัวอย่าง (Sample Pan)



ภาพผนวกที่ ข30 เครื่องดีฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริมิเตอร์



ภาพผนวกที่ ข31 ระบบคอมพิวเตอร์ควบคุมเครื่องดีฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริมิเตอร์



ภาคผนวก ค

ผลงานวิจัยที่นำเสนอในการประชุมวิชาการ



ผลของการดัดแปรกากมะพร้าวด้วยวิธีทางกายภาพต่อสมบัติทางเคมีกายภาพและประสิทธิภาพ
การย่อยคาร์โบไฮเดรตในหลอดทดลองของปลาเศรษฐกิจ

Effects of Physical Modification of Coconut Meal on Physicochemical Property and *In Vitro*
Carbohydrate Digestibility in Economic Fish

สุนตรา ชุมแวงวาปี¹ ศรีศักดิ์ สุนทรไชย^{2*} และการณ ทองประจุแก้ว³

Sunetra Chumwaengwapee¹ Sarisak Soontornchai^{2*} and Karun Thongprajukeaw³

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของการแช่น้ำ การใช้คลื่นไมโครเวฟ การฉายรังสีแกมมา และการฉายลำแสงอิเล็กตรอนต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางเคมีกายภาพของกากมะพร้าว และศึกษาประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตในหลอดทดลองโดยใช้เอนไซม์ที่สกัดจากปลานิล (*Oreochromis niloticus*) จากการศึกษาพบว่า การดัดแปรมีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการลดลงของเชื้อใย ในขณะที่ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยได้มีค่าเพิ่มขึ้น ($P < 0.05$) สมบัติทางเคมีกายภาพ ได้แก่ โครงสร้างทางจุลภาค และความเป็นผลึก มีการเปลี่ยนแปลงหลังจากผ่านการดัดแปร เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตในหลอดทดลองพบว่า กากมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปรโดยวิธีแช่น้ำและใช้คลื่นไมโครเวฟมีประสิทธิภาพการย่อยในหลอดทดลองสูงสุด รองลงมาคือ การฉายลำแสงอิเล็กตรอนและรังสีแกมมา ตามลำดับ ดังนั้น การดัดแปรกากมะพร้าวด้วยการแช่น้ำหรือใช้คลื่นไมโครเวฟจึงสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์จากคาร์โบไฮเดรตของปลาเศรษฐกิจได้

คำสำคัญ: กากมะพร้าว การดัดแปร สมบัติทางเคมีกายภาพ คาร์โบไฮเดรต ปลาเศรษฐกิจ

Abstract

This research aimed to study effects of water soaking, microwave irradiation, gamma irradiation and electron beam on physicochemical property of coconut meal and *in vitro* carbohydrate digestibility by using digestive enzymes from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). The result showed that modified methods had significant effects by decreasing crude fiber and increasing available carbohydrates ($P < 0.05$). Physicochemical properties including microstructure and crystallinity were altered after modification. The highest *in vitro* carbohydrate digestibility values were observed in soaked and microwave-irradiated coconut meals, followed by electron beam and gamma irradiation, respectively. Therefore, soaking or microwave irradiation could be used for increasing efficiency of carbohydrate digestibility in economic fish.

Keywords: Coconut meal, Modification, Physicochemical property, Carbohydrate, Economic Fish

¹ นักศึกษาปริญญาโท สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพ วิชาเอกการจัดการสิ่งแวดล้อมอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช นนทบุรี 11120

² รศ.ดร., แขนงวิชาสาธารณสุขศาสตร์ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช นนทบุรี 11120

³ อ.ดร., ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90112

*Corresponding author: e-mail: hsasosar@hotmail.com Tel. 0-2504-8032

บทนำ

กากมะพร้าวเป็นผลพลอยได้ที่เกิดขึ้นปริมาณมากจากอุตสาหกรรมผลิตน้ำกะทิ และน้ำมันมะพร้าว ผลพลอยได้ดังกล่าวมีราคาถูกและเหมาะที่จะนำมาผลิตเป็นวัตถุดิบอาหารให้กับสัตว์เลี้ยง การศึกษาเกี่ยวกับวัตถุดิบอาหารสัตว์พบว่า กากมะพร้าวสามารถใช้เป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ได้หลายชนิด สำหรับการใช้อากมะพร้าวในสัตว์น้ำยังไม่เป็นที่แพร่หลายและมีข้อจำกัดหลายอย่าง โดยมีการใช้บ้างในปลาดุก (ณัฐพงศ์ เมืองสุวรรณ 2550) ปลาดุกเพียนขาว (เกษม เขตวัน และพิจิตร พันธุ์ศรี 2536) ปลานิล (Olude *et al.*, 2008) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม การใช้อากมะพร้าวในปริมาณที่ไม่เหมาะสมอาจทำให้สัตว์เกิดอาการท้องเสีย เนื่องจากกากมะพร้าวมีองค์ประกอบของเยื่อใยที่ยากต่อการย่อย ซึ่งเยื่อใยดังกล่าวจะห่อหุ้มสารอาหารและเพิ่มความหนืดในท่อทางเดินอาหาร ทำให้ประสิทธิภาพการย่อยและการใช้ประโยชน์จากวัตถุดิบเกิดขึ้นได้น้อย (Choct and Annison, 1992) นอกจากนี้ กากมะพร้าวยังมีองค์ประกอบทางโภชนาการที่ไม่เหมาะสม โดยมีปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นบางชนิดในปริมาณน้อย มีการสูญเสียคุณค่าทางโภชนาการเนื่องจากกระบวนการผลิตที่ต้องใช้ความร้อน และมีองค์ประกอบที่สัตว์ไม่สามารถย่อยได้เป็นจำนวนมาก ได้แก่ แมนแนน กาแลกโตแมนแนน และเซลลูโลส เมื่อนำไปใช้เป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์จะทำให้ประสิทธิภาพการย่อยอาหารต่ำซึ่งอาจส่งผลต่ออัตราการรอด การเจริญเติบโต และการเจริญพันธุ์ได้

จากการศึกษาการคัดแปรโครงสร้างวัตถุดิบอาหารหรือผลพลอยได้ทางการเกษตรหลายชนิดพบว่าสามารถทำให้วัตถุดิบมีประสิทธิภาพการย่อยที่ดีขึ้น สำหรับการศึกษาในกากมะพร้าวพบว่าการคัดแปรโดยวิธีการแช่น้ำ (Olude *et al.*, 2008) ฉายรังสีแกมมา (Sunthornchot *et al.*, 2009) หรือการเสริมเอนไซม์สังเคราะห์ (Sundu *et al.*, 2006) สามารถปรับปรุงประสิทธิภาพการย่อยและการใช้ประโยชน์จากวัตถุดิบอาหารได้ เนื่องจากการคัดแปรจะทำให้วัตถุดิบเปลี่ยนแปลงสมบัติทางเคมีกายภาพให้เหมาะสมต่อการไฮโดรไลสของเอนไซม์ย่อยอาหาร เช่น โครงสร้างพื้นผิว (Bak *et al.*, 2009) ความเป็นผลึก (Chung *et al.*, 2010) เป็นต้น การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงคุณภาพคาร์โบไฮเดรตจากกากมะพร้าวเพื่อใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบอาหารที่มีคุณภาพของสัตว์น้ำ ซึ่งอาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยและการใช้ประโยชน์จากวัตถุดิบ รวมทั้งเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ลดต้นทุนในกระบวนการผลิต และช่วยส่งเสริมให้มีการใช้ผลพลอยได้ดังกล่าวอย่างมีประสิทธิภาพ

วิธีการวิจัย

1. การคัดแปรกากมะพร้าว

คัดแปรกากมะพร้าวโดยวิธีทางกายภาพ ได้แก่ 1) การแช่น้ำ โดยชั่งกากมะพร้าวน้ำหนัก 100 กรัม แล้วนำมาแช่ในน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10 (มวลต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง 2) การใช้คลื่นไมโครเวฟ โดยนำกากมะพร้าวมาผสมให้เข้ากับน้ำในอัตราส่วน 1:9 (มวลต่อปริมาตร) และนำไปไมโครเวฟโดยใช้กำลังไฟฟ้า 700 วัตต์ ความถี่ 2,450 กิโลเฮิร์ตซ์ เป็นเวลา 5 นาที 3) การใช้รังสีแกมมา โดยนำกากมะพร้าวไปฉายรังสีแกมมาที่ระดับ 60 กิโลเกรย์ (Sunthornchot *et al.*, 2009) โดยแหล่งกำเนิดของรังสีมาจากโคบอลต์-60 และ 4) การใช้ลำแสงอิเล็กตรอน โดยนำกากมะพร้าวไปผ่านลำแสงอิเล็กตรอนที่ระดับ 30 กิโลเกรย์ และ 10 เมกะอิเล็กตรอนโวลต์ (Shawrang *et al.*, 2011)

2. การเตรียมตัวอย่าง

นำกากมะพร้าวที่ผ่านการคัดแปรและบดให้ละเอียดมาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อใช้สำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพและการประเมินประสิทธิภาพการย่อยในหลอดทดลองจะใช้กากมะพร้าวที่ผ่านการทำให้แห้งโดยใช้เครื่องทำแห้งภายใต้ความดันและอุณหภูมิต่ำ (Delta 2-24 LSC, Germany)

3. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ปริมาณโปรตีน ไขมัน เกลือ และเถ้าตามวิธีการของ AOAC (2005) สำหรับปริมาณของคาร์โบไฮเดรตใช้วิธีการคำนวณจากผลต่างของค่าโภชนาการ

4. การศึกษาสมบัติทางเคมีกายภาพ

4.1 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระดับจุลภาค

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของกากมะพร้าวในระดับจุลภาคโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Quanta 400, FEI, Czech Republic) โดยเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการติดบนกาวสองหน้าบนแท่งอะลูมิเนียม (Aluminium stub) และเคลือบตัวอย่างด้วยทอง ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้เท่ากับ 15 กิโลโวลต์

4.2 การเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์

พิสูจน์เอกลักษณ์ในการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์และคำนวณปริมาณผลึกของกากมะพร้าวที่ผ่านการคัดแปรโดยใช้เครื่องเอกซเรย์ดิฟแฟร็กโทมิเตอร์ (X'Pert MPD, Philips, Netherlands) ที่ความต่างศักย์ 40 กิโลโวลต์ กำลังไฟฟ้า 40 มิลลิแอมแปร์ ความเร็วของการสแกน 1 องศาต่อนาที

5. การประเมินประสิทธิภาพการย่อยในหลอดทดลอง (*In vitro* digestibility)

5.1 การเก็บตัวอย่างปลาและการเตรียมเอนไซม์

สุ่มเก็บตัวอย่างปลานิล (น้ำหนัก 800–900 กรัม ความยาวเหยียด 33–36 เซนติเมตร) จำนวน 4 ตัว ($n = 4$) จากฟาร์มในอำเภอลำทะเมนชัย จังหวัดสงขลา หลังจากนั้น สลับปลาในน้ำแข็ง เก็บตัวอย่างลำไส้ และนำมาสกัดเอนไซม์ย่อยอาหารโดยบดตัวอย่างให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นละเอียดใน 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl pH 8 ที่ประกอบด้วย 200 มิลลิโมลาร์ NaCl ในอัตราส่วน 1:2 (มวลต่อปริมาตร) หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว $15,000 \times g$ นาน 30 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างส่วนใสเพื่อใช้เป็นแหล่งของเอนไซม์เพื่อประเมินประสิทธิภาพการย่อยในหลอดทดลอง

5.2 การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรต

ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตของกากมะพร้าวตามวิธีการของ Thongprajukeaw *et al.* (2011) โดยผสมกากมะพร้าวที่คัดแปรแล้ว 5 มิลลิกรัม กับ 50 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร คลอแรมเฟนิคอล ความเข้มข้น 0.5% ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเอนไซม์สกัดปริมาตร 125 ไมโครลิตร ให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และหยุด

ปฏิกิริยาโดยการนำสารละลายไปต้มในน้ำเดือด 10 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นดูดสารละลายส่วนใสที่ผ่าน การย่อยปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายกรดไคไนโตรซาลิไซลิกความเข้มข้น 1% ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร และเปรียบเทียบกับกราฟ มาตรฐานของน้ำตาลมอลโทส

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

แสดงผลข้อมูลในรูปของค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูล ด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

1. ปริมาณของคาร์โบไฮเดรต

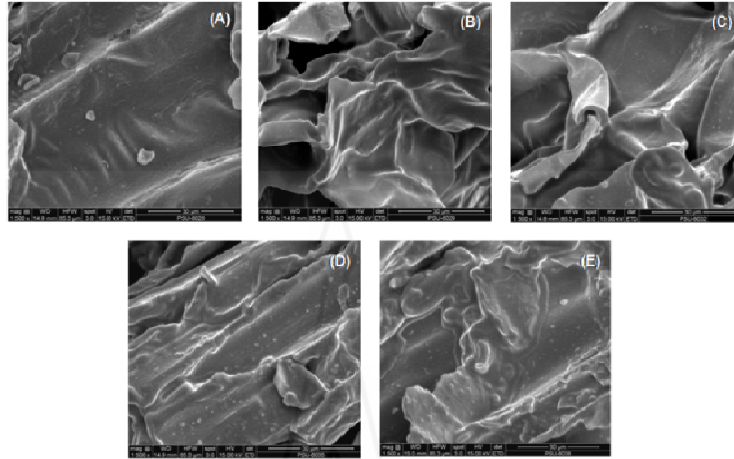
ปริมาณเชื้อไขของกากมะพร้าวที่ผ่านการคัดแปรมีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยเชื้อไขของกากมะพร้าวที่ผ่านการแช่น้ำ การใช้คลื่นไมโครเวฟ การฉายรังสีแกมมา และลำแสงอิเล็กตรอน มีค่าเท่ากับ 33.02 ± 0.41 , 28.74 ± 0.10 , 24.38 ± 0.61 และ $25.49 \pm 0.34\%$ (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกากมะพร้าวที่ไม่ผ่านการคัดแปรมีค่าเท่ากับ $36.89 \pm 0.05\%$ ผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาใน วัตถุประสงค์หลายชนิดที่ผ่านการคัดแปรมี เช่น เปลือกถั่วเหลือง เปลือกถั่วลิสง เมล็ดทานตะวัน (Al-Masri and Guenther, 1999) และฟางข้าวสาลี (Kristensen *et al.*, 2008) การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวสัมพันธ์กับปริมาณ คาร์โบไฮเดรตที่ย่อยได้ที่เพิ่มขึ้นจาก 26.45% (กากมะพร้าวหูดควบคุม) เป็น 31.04, 35.39, 37.63 และ 37.44% ในกากมะพร้าวที่ผ่านการแช่น้ำ การใช้คลื่นไมโครเวฟ การฉายรังสีแกมมา และลำแสงอิเล็กตรอน ตามลำดับ การ เพิ่มขึ้นของคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยได้นี้ อาจเกิดขึ้นเนื่องจากโครงสร้างผลึกของคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยได้ยากถูกทำลาย หลังจากการคัดแปรมี ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในแป้งข้าวโพดและแป้งมันฝรั่งที่พบว่า ประสิทธิภาพการย่อยของ คาร์โบไฮเดรตที่ย่อยได้เร็ว (Rapidly digestible starch) มีค่าเพิ่มขึ้นหลังจากการคัดแปรมี (Chung and Liu, 2009; 2010)

2. สมบัติทางเคมีกายภาพ

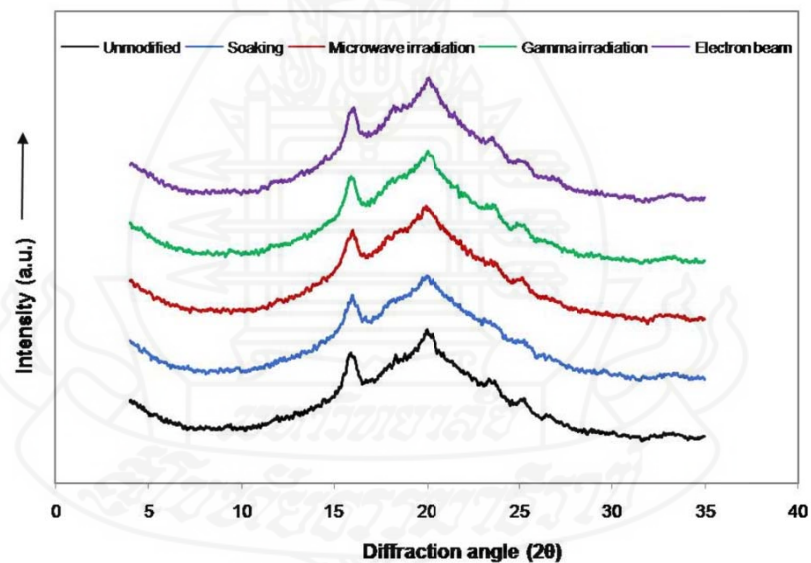
2.1 โครงสร้างระดับจุลภาค

โครงสร้างของกากมะพร้าวที่ผ่านการคัดแปรมีมีความแตกต่างจากกากมะพร้าวหูดควบคุม (รูปที่ 1A) โดยการแช่น้ำ (รูปที่ 1B) และการใช้คลื่นไมโครเวฟ (รูปที่ 1C) ทำให้โครงสร้างของกากมะพร้าวมีลักษณะ โกงแฉะและม้วนพับมากขึ้น ผลที่ได้ใกล้เคียงกับการศึกษาในแป้งข้าวโพด (Chung and Liu, 2009) ซึ่งการ เปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวเพื่อให้เอนไซม์สามารถไฮโดรไลสวัตถุดิบอาหารได้ดี ขณะที่กาก มะพร้าวที่ผ่านการคัดแปรมีโดยใช้รังสีแกมมา (รูปที่ 1D) และลำแสงอิเล็กตรอน (รูปที่ 1E) จะมีการม้วนพับของ โครงสร้างเพียงเล็กน้อย พื้นที่ผิวบางส่วนถูกทำลายและมีการแตกหัก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในแป้งมันฝรั่งและ แป้งจากถั่ว (Chung and Liu, 2010) ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา เมื่อเปรียบเทียบกับแป้งที่ไม่ผ่านกระบวนการ

ดังนั้นการดัดแปรเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวของกากมะพร้าวจึงอาจช่วยให้สัตว์มีประสิทธิภาพการย่อยในท่อนำอาหารดีขึ้น



รูปที่ 1 โครงสร้างระดับจุลภาคของกากมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปร (A) และกากมะพร้าวที่ดัดแปรโดยการแช่น้ำ (B) การใช้คลื่นไมโครเวฟ (C) การฉายรังสีแกมมา (D) และลำแสงอิเล็กตรอน (E) ที่กำลังขยาย 1,500 เท่า



รูปที่ 2 ดิฟแฟรคโทแกรมแสดงการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ของกากมะพร้าวที่ไม่ผ่านการดัดแปร และกากมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปรด้วยวิธีการแช่น้ำ การใช้คลื่นไมโครเวฟ การฉายรังสีแกมมา และการฉายลำแสงอิเล็กตรอน

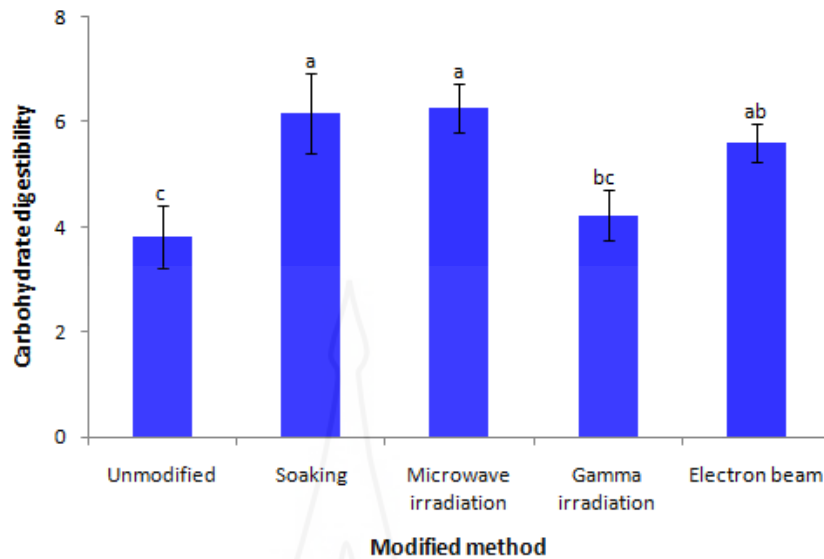
2.2 การเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์

รูปแบบการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ของกากมะพร้าวก่อนและหลังการตัดแปรมีความคล้ายคลึงกัน (รูปที่ 2) โดยพบพีคหลักที่มุมเลี้ยวเบน (2θ) 15.9° , 20.1° , 23.6° และ 25.2° ผลการคำนวณความเป็นผลึกสัมพัทธ์พบว่า กากมะพร้าวที่ผ่านการตัดแปรมีค่าความเป็นผลึกลดลง โดยการตัดแปรรด้วยวิธีแช่น้ำ การใช้คลื่นไมโครเวฟ ฉายรังสีแกมมา และลำแสงอิเล็กตรอน มีค่าความเป็นผลึกสัมพัทธ์เท่ากับ 3.93, 4.40, 5.16 และ 5.63% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกากมะพร้าวที่ไม่ผ่านการตัดแปรร (5.66%) การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจเกิดขึ้นจากการที่โครงสร้างของผลึกบางส่วนถูกทำลายหลังจากได้รับการตัดแปรร ซึ่งทำให้โครงสร้างส่วนอสัณฐาน (Amorphous) ของกากมะพร้าวมีค่าสูงขึ้น และอาจทำให้การไฮโดรไลส์ของเอนไซม์ย่อยอาหารสูงขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาในแบ่งที่พบว่าประสิทธิภาพการย่อยจะสูงขึ้นเมื่อแป้งมีความเป็นผลึกสัมพัทธ์ต่ำ (Chung and Liu, 2010; Kaur *et al.*, 2010)

3. ประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตในหลอดทดลอง

การตัดแปรรกากมะพร้าวมีผลต่อประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตของปลานิลอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$, รูปที่ 3) โดยการใช้คลื่นไมโครเวฟและการแช่น้ำทำให้ประสิทธิภาพการย่อยมีค่าสูงสุด รองลงมาคือการใช้ลำแสงอิเล็กตรอน ขณะที่การใช้รังสีแกมมาพบว่าค่าที่ได้ไม่แตกต่างจากกากมะพร้าวในชุดควบคุม ($P > 0.05$) การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยได้ และสมบัติทางเคมีกายภาพที่เหมาะสมต่อการไฮโดรไลส์ของวัตถุดิบ ผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตใน Switch grass (Hu and Wen, 2008) ที่พบว่า มีค่าสูงขึ้นเมื่อผ่านการตัดแปรรโดยใช้คลื่นไมโครเวฟ เนื่องจากกระบวนการดังกล่าวมีผลต่อการสลายตัวของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน รวมทั้งสอดคล้องกับผลการเจริญเติบโตของปลานิลวัยอ่อนที่เลี้ยงด้วยกากมะพร้าวที่ผ่านการแช่น้ำ (Olude *et al.*, 2008) หรือปลาการ์ฟที่เลี้ยงด้วยเมล็ด Sesbania ที่ผ่านการแช่น้ำ (Hossain *et al.*, 2001)

กากมะพร้าวที่ผ่านการตัดแปรรโดยใช้คลื่นไมโครเวฟและการแช่น้ำมีประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่หากพิจารณาขั้นตอนและวิธีการในการตัดแปรรแล้ว วิธีการแช่น้ำสามารถทำได้ง่าย ประหยัดค่าใช้จ่าย และมีรายงานในวัตถุดิบหลายชนิดว่า สามารถช่วยลดปริมาณสารต้านโภชนาการได้หลายชนิด เช่น แทนนิน สารประกอบฟีนอล กรดไฟติก สารยับยั้งการทำงานของอะไมเลส สารยับยั้งการทำงานของทริปซิน (Abd El-Hady and Habiba, 2003; Vijayakumari *et al.*, 2007; Khandelwal *et al.*, 2010) เป็นต้น ซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยในหลอดให้สูงขึ้นได้ ดังนั้น การตัดแปรรกากมะพร้าวโดยการแช่น้ำหรือผ่านการไมโครเวฟอาจเป็นแนวทางเลือกหนึ่งที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อย และการใช้ประโยชน์จากกากมะพร้าวได้ดียิ่งขึ้น



รูปที่ 3 ประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตในหลอดทดลอง ($\mu\text{mol maltose g feedstuff}^{-1}$) โดยใช้เอนไซม์ที่สกัดจากปลานิล (อะไมเลส 1,000 ยูนิต) ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แสดงด้วยตัวอักษรต่างกัน

สรุปผลการวิจัย

การตัดแปรงกากมะพร้าวด้วยวิธีการแช่น้ำเป็นวิธีที่เหมาะสมในการผลิตอาหารสัตว์น้ำมากที่สุด เนื่องจากทำให้เชื้อของกากมะพร้าวมีค่าลดลง ในขณะที่ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยได้มีค่าเพิ่มขึ้น และมีการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางเคมีกายภาพให้เหมาะสม ได้แก่ โครงสร้างทางจุลภาค และความเป็นผลึก ทำให้ประสิทธิภาพการย่อยในหลอดทดลองมีค่าสูงขึ้น นอกจากนี้ วิธีการแช่น้ำยังสามารถทำได้ง่าย สะดวก และประหยัดค่าใช้จ่าย ดังนั้น การแช่น้ำจึงเป็นทางเลือกที่เหมาะสมในการเพิ่มประสิทธิภาพในการใช้ประโยชน์จากวัตถุดิบอาหารสำหรับสัตว์น้ำ

คำขอบคุณ

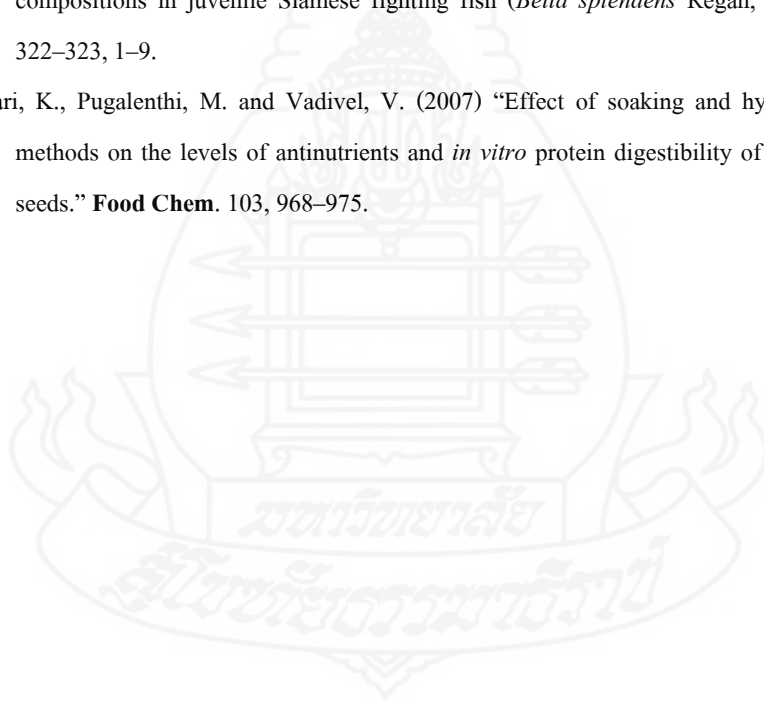
งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนในการทำวิทยานิพนธ์จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ขอขอบคุณภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ และอาจารย์เทิดทูน คำรงค์ฤทธิรามาตย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการวิจัยและให้ความช่วยเหลือในการวิเคราะห์ข้อมูลการเลี้ยงเบบรังสีเอกซ์

เอกสารอ้างอิง

เกษม เขตวัน และพิจิตร พันธุ์ศรี (2536) “เปรียบเทียบการใช้ประโยชน์จากกากมะพร้าวและใบกระถินปนเพื่อเป็นแหล่งอาหารเสริมโปรตีนในการเลี้ยงปลาตะเพียนขาวในกระชัง.” ใน: การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 31, สาขาประมง, กรุงเทพฯ.

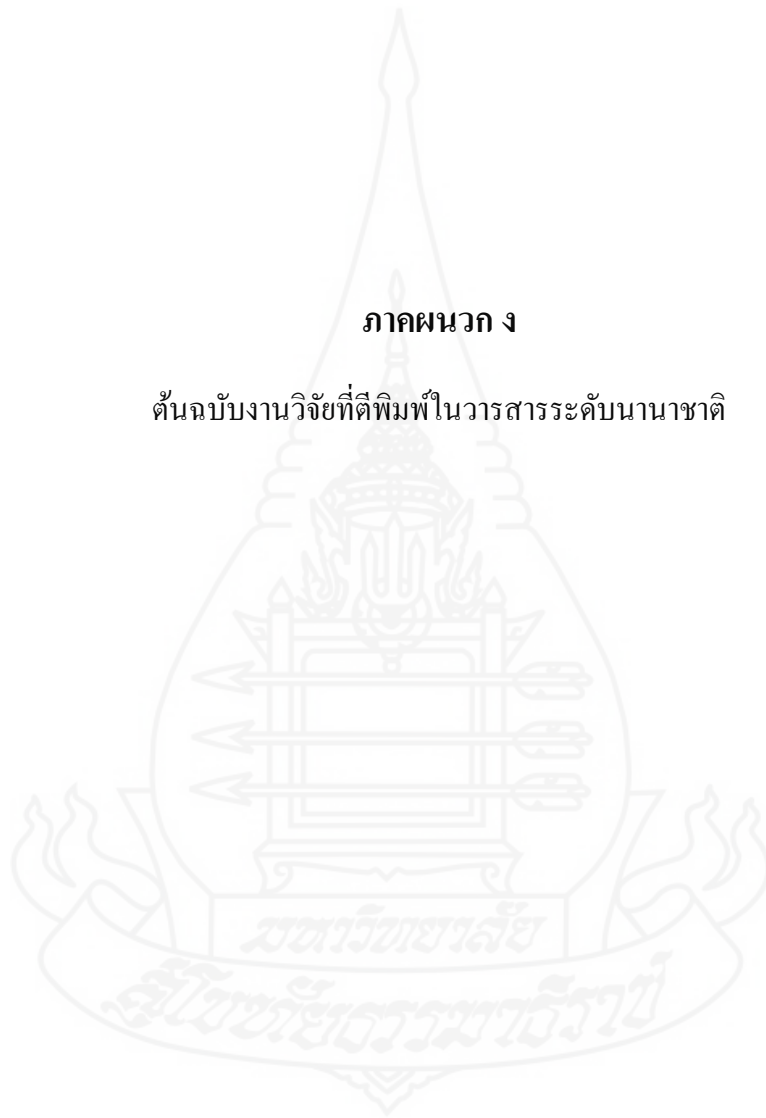
- ณัฐพงศ์ เมืองสุวรรณ (2550) “ผลของกากมะพร้าวและกากมันสำปะหลังต่อการเจริญเติบโต การย่อยได้ และการใช้ประโยชน์ของอาหารในปลาดุกอุกผสม (*Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*).” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Abd El-Hady, E.A. and Habiba, R.A. (2003) “Effect of soaking and extrusion conditions on antinutrients and protein digestibility of legume seeds.” **Lebensm. Wiss. U. Technol.** 36, 285–293.
- Al-Masri, M.R. and Guenther, K.D. (1999) “Changes in digestibility and cell-wall constituents of some agricultural by-products due to gamma irradiation and urea treatments.” **Radiat. Phys. Chem.** 55(1), 323–329.
- AOAC. (2005) **Official Method of Analysis**. 18th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- Bak, J.S., Ko, J.K., Han, Y.H., Lee, B.C., Choi, I.G. and Kim, K.H. (2009) “Improved enzymatic hydrolysis yield of rice straw using electron beam irradiation pretreatment.” **Biores. Technol.** 100(3), 1285–1290.
- Choct, M. and Annison, G. (1992) “Anti-nutritive effect of wheat pentosans in broiler chickens: roles of viscosity and gut microflora.” **British Poult. Sci.** 33(1), 821–834.
- Chung, H.J., Lee, S.Y., Kim, J.H., Lee, J.W., Byun, M.W. and Lim, S.T. (2010) “Pasting characteristics and *in vitro* digestibility of γ -irradiated RS₄ waxy maize starches.” **J. Cereal Sci.** 52(1), 53–58.
- Chung, H.J. and Liu, Q. (2009) “Effect of gamma irradiation on molecular structure and physicochemical properties of corn starch.” **J. Food Sci.** 74(5), 353–361.
- Chung, H.J., and Liu, Q. (2010) “Molecular structure and physicochemical properties of potato and bean starches as affected by gamma-irradiation.” **Int. J. Biol. Macromol.** 47(1), 214–222.
- Hossain, M.A., Focken, U. and Becker, K. (2001) “Effect of soaking and soaking followed by autoclaving of Sesbania seeds on growth and feed utilisation in common carp, *Cyprinus carpio* L.” **Aquaculture**. 203(1), 133–148.
- Hu, Z. and Wen, Z. (2008) “Enhancing enzymatic digestibility of switchgrass by microwave assisted alkali pretreatment.” **Biochem. Eng. J.** 38, 369–378.
- Kaur, M., Sandhu, K.S. and Lim, S.T. (2010) “Microstructure, physicochemical properties and *in vitro* digestibility of starches from different Indian lentil (*Lens culinaris*) cultivars.” **Carbohydr. Polym.** 79(2), 349–355.
- Khandelwal, S., Udipi, S.A. and Ghugre, P. (2010) “Polyphenols and tannins in Indian pulses: Effect of soaking, germination and pressure cooking.” **Food Res. Int.** 43 (2010), 526–530.
- Kristensen, J.B., Thygesen, L.G., Felby, C., Jørgensen, H. and Elder, T. (2008) “Cell-wall structural changes in wheat straw pretreated for bioethanol production.” **Biotechnol. Biofuel.** doi:10.1186/1754-6834-1-5.

- Olude, O.O., Alegbeleye, W.O.A. and Obasa, S.O. (2008) "The use of soaked copra meal as a partial substitute for soybean meal in the diet of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings." **Livest. Res. Rural Dev.** 20(10), Article 169.
- Shawrang, P., Sadeghi, A.A., Behgar, M., Zarehshahi, H., and Shahhoseini, G. (2011) "Study of chemical compositions, anti-nutritional contents and digestibility of electron beam irradiated sorghum grains." **Food Chem.** 125(2), 376–379.
- Sundu, B., Kumar, A. and Dingle, J. (2006) "Response of broiler chicks fed increasing levels of copra meal and enzymes." **Int. J. Poult. Sci.** 5(1), 13–18.
- Sunthornchot, J., Engkagul, A., Kovitvadhi, U., Pakkong, P. and Choowongkamon, K. (2009) "Development of radiation feed for commercial product of adult Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*." *In: The 35th Congress on Science and Technology of Thailand, Chonburi, Thailand.*
- Thongprajukaew, K., Kovitvadhi, U., Kovitvadhi, S., Somsueb P. and Rungruangsak-Torrissen, K. (2011) "Effects of different modified diets on growth, digestive enzyme activities and muscle compositions in juvenile Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910)." **Aquaculture.** 322–323, 1–9.
- Vijayakumari, K., Pugalenth, M. and Vadivel, V. (2007) "Effect of soaking and hydrothermal processing methods on the levels of antinutrients and *in vitro* protein digestibility of *Bauhinia purpurea* L. seeds." **Food Chem.** 103, 968–975.



ภาคผนวก ง

ต้นฉบับงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ



The effects of physical modification of coconut meal on its chemical composition, physicochemical properties and *in vitro* carbohydrate digestibility in economic fish

Sunetra Chumwaengwapee^a, Sarisak Soontornchai^a, Karun Thongprajukeaw^{b,*}

^a School of Health Science, Sukhothai Thammathirat Open University, Nonthaburi 11120, Thailand

^b Department of Applied Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla 90112, Thailand

* Corresponding author, e-mail: karun.t@psu.ac.th.

ABSTRACT: This research aimed to study the effects of the physical modification of coconut meal (CM). Four modification methods were tested: water soaking, and microwave, gamma, and electron beam irradiation. The study measured the effects on the chemical composition and physicochemical properties of CM, and its *in vitro* carbohydrate digestibility based on the use of digestive enzyme extracts from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and silver barb (*Barbonymus gonionotus*). The findings showed that the method of modification had significant effects by decreasing the level of crude fiber but increasing the available carbohydrates ($p < 0.05$). Furthermore, the physicochemical properties including pH, water solubility, microstructure, thermal properties and crystallinity were notably affected after modification by water soaking. This modification method also increased the carbohydrate digestibility by the fish enzymes tested. Therefore, the findings of this study suggest that the quality of CM as a feedstuff can be improved by water soaking.

KEYWORDS: carbohydrate, coconut meal, economic fish, modification, soaking

INTRODUCTION

Coconut meal (CM), which is a common industrial by-product of the production of coconut oil and coconut milk, is generally used as a feed ingredient for rearing terrestrial animals. For aquatic species, however, and especially for fish, limited information is currently available on the use of CM in diets. This may be due to the nutritional limitations of CM, such as deficiencies in important amino acids and low protein digestibility¹. Moreover, CM contains high dietary fiber,

mainly in the form of mannan (26%), galactomannan (61%) and cellulose (13%)². These components may impair the digestibility and utilization of nutrients, by encapsulating them or by increasing the viscosity of the intestinal contents. Therefore, decreasing the dietary fiber in CM may improve the utilization of the available carbohydrate as well as having indirect effects on improving the other nutritional components.

The modification of food or feed ingredients can cause significant improvements in their physicochemical properties and the digestibility of the various raw materials. Soaked CM, can be used as a replacement for soybean meal (30%) without any deleterious effect on the growth performance and nutrient utilization of fingerlings of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*³. Moreover, other physical procedures, including microwave irradiation (non-ionizing radiation)^{4,5}, gamma irradiation^{6,7} and electron beam (ionizing radiation)^{8,9}, have also been used to improve the nutritional quality of raw materials. These methods can cause alteration of unavailable constituents by changing or cleaving chemical bondings. On the other hand, some conventional methods are frequently carried out under long term heating which can often lead to nutritional loss and also have less effect on destructing unavailable carbohydrates.

This research aimed to study the effects of different methods of modifying CM and the improvements in the level of available nutrients archived, especially on the available carbohydrates. Analysis of the chemical composition, physicochemical properties and *in vitro* digestibility were the primary means used to evaluate the nutritional quality. Two freshwater fishes with high economic values, and different feeding habits, namely the omnivorous Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and the herbivorous silver barb (*Barbonymus gonionotus*), were used as sources of digestive enzymes for *in vitro* screening. The findings from present study might be used to improve the nutritional quality of CM as a feed ingredient for the production of aquatic animals.

MATERIALS AND METHODS

Modification of CM

CM from pressed coconut meat was obtained from three local markets in Hat-Yai, Songkhla, Thailand. Unprocessed CM was used as a control sample with another four samples being physically modified. The modification methods used were: 1) water soaking; the CM was soaked in distilled water (1: 10 w/v) for 12 h at ambient temperature; 2) microwave irradiation; 50 g of CM was placed in a beaker, mixed with distilled water (1:9 w/v) and then cooked at 800 W in a microwave oven (MW 71B, Samsung, Malaysia) under agitation for 5 min; 3) gamma irradiation; the CM sample was irradiated at a dose of 30 kGy using ^{60}Co from a gamma irradiator (JS 8900 IR-155, *MDS Nordion*, Canada); and 4) electron beam irradiation; CM was irradiated at a dose of 30 kGy at a fixed beam energy of 10 MeV using an electron accelerator (TT-200, IBA Co. Ltd., Belgium). For gamma and electron beam irradiation, the processes were conducted at The Institute of Nuclear Technology (Public Organization), Thailand.

Preparation of CM

The samples of raw and modified CMs were dried using a freeze dryer (Delta 2-24 LSC, Germany) for 48 h, ground and sieved. All the prepared samples were packed in polyethylene bags covered by black plastic and then kept in desiccators for later analysis of their chemical composition and physicochemical properties.

Chemical composition

The chemical composition of the CM samples including their protein, lipid, ash and fiber content were analyzed according to standard methods of the AOAC¹⁰. The nitrogen free extract (NFE) was calculated based on the difference. All the chemical compositions are reported on dry matter basis.

Physicochemical properties

Determination of pH and water solubility

One gram of CM was suspended in 25 ml of water at 25°C and agitated for 10 min¹¹. The measurement of pH was conducted using a pH meter (Cyber Scan 510, Eutech Instrument, Singapore). The water solubility was determined according to the method of Chung et al.⁷. Briefly, one gram of CM was mixed with 10 ml of water, gently stirred for 1 h at room temperature and centrifuged at 1500g for 10 min. The solubility of the CM was calculated from the ratio between the dissolved solid weight in supernatant and the dried solid weight in the original sample.

Microstructure

The CM samples were mounted by double-sticky tape on an aluminum stub and coated with gold. Microscopic pictures of the CM samples were produced using a scanning electron microscope (Quanta 400, FEI, Czech Republic) at 50, 250 and 1500× magnifications. The energy potential during micrography was 15 kV.

X-ray diffraction patterns

The diffraction patterns of the CM samples were determined with an x-ray diffractometer (X'Pert MPD, Philips, Netherlands) operated at a voltage of 40 kV and a current of 40 mA current. Diffractograms were recorded between 4° and 35° (2θ) with a scanning rate of 1°/min.

Thermal properties

The thermal properties of the CM samples were measured using a differential scanning calorimeter (DSC7, Perkin Elmer, USA). Approximately 3 mg of a freeze-dried sample was placed in an aluminum pan, and sealed, then allowed to equilibrate at room temperature for 1 h, then heated from 40 to 180°C at a rate of 5°C/min. The thermal parameters, onset (T_o), peak (T_p) and conclusion (T_c) temperatures, and transition enthalpy (ΔH), were recorded automatically.

Determination of *in vitro* carbohydrate digestibility

Fish sampling and digestive enzyme extraction

One year old Nile tilapia ($n = 3$, 800–900 g body weight and 33–36 cm total length) and six months old silver barb ($n = 3$, 400–450 g body weight and 29–30 cm total length) were randomly collected from a farm in Hat-Yai, Songkhla, Thailand. The fishes were fed *ad libitum*, two times daily (08:00 and 18:00 h) with a commercial diet (20% crude protein). The fish were then killed by chilling in ice. The intestines of all the fish were carefully collected, kept in ice and then transported to the Department of Applied Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University. Subsequently, the samples were homogenized in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8) containing 200 mM NaCl (1: 4 w/v) using a micro-homogenizer (THP-220; Omni International, Kennesaw GA, USA). Centrifugation of the homogenate was carried out at 15000g for 30 min at 4°C. The supernatant was collected and then kept at –20°C.

In vitro digestibility

The crude enzyme extracts were dialyzed overnight against the extraction buffer. The *in vitro* reaction was performed according to the method described in Thongprajukaew et al.¹². The carbohydrate digestibility was determined by quantitative analysis of the liberated maltose after incubation. The digestibility values were calculated, standardized with equal amylase activity, and are expressed as μmol maltose/g.

Statistical analysis

Data are reported as mean \pm SE from triplicate observations. The significant differences between the means were analyzed by Duncan's Multiple Range Test at 95% confidence levels.

RESULTS

Chemical composition

Physical modification had the effects on the chemical composition of the CM samples shown in Table 1. A significant decrease in protein content was found in the CM modified by electron beam irradiation ($p < 0.05$) whereas the protein content of the samples modified by the other

methods were not statistically different when compared with the control sample ($p > 0.05$). The lipid content increased in the gamma-irradiated CM, and decreased in the water-soaked and microwave-irradiated CM samples. The ash content increased significantly in the water-soaked sample and relatively higher values were found in the samples modified by other methods. The crude fiber decreased progressively after all the modifications whereas the available carbohydrate increased inversely.

Physicochemical properties

pH and water solubility

Significantly increased pH values were found in the water-soaked and microwave-irradiated CM samples, whereas a decrease in pH was observed in the CMs modified by gamma and electron beam irradiation ($p < 0.05$, Table 1). The water solubility of the nutrients had the highest value in the samples pretreated by soaking (Table 1), with, similar solubility being detected between the control sample and the samples modified by other methods.

Microstructure

Modification had the effect of changing the microscopic structure of the CM samples (Fig.1). Porous and concave surfaces were similarly found in the CM samples modified by water soaking (Fig. 1d–f) and microwave irradiation (Fig. 1g–i). However, the area of rough surface was relatively higher in the sample pretreated by soaking as compared to the microwave-irradiated sample. Damaged surfaces with shallow grooves were observed after modification by gamma (Fig. 1j–l) and electron beam (Fig. 1m–o) irradiation.

Table 1 Chemical composition and physicochemical properties of raw and modified CM samples.

Data were calculated from triplicate determinations and are expressed on dry matter basis.

| Parameter | Unmodified | Water soaking | Microwave irradiation | Gamma irradiation | Electron beam |
|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Chemical compositions (%) | | | | | |
| Crude protein | 4.63 ± 0.05 ^a | 4.60 ± 0.00 ^{ab} | 4.70 ± 0.05 ^a | 4.68 ± 0.00 ^a | 4.46 ± 0.04 ^b |
| Crude lipid | 31.00 ± 0.01 ^b | 30.08 ± 0.10 ^c | 30.08 ± 0.03 ^c | 32.14 ± 0.25 ^a | 31.44 ± 0.22 ^b |
| Ash | 1.03 ± 0.00 ^c | 1.26 ± 0.06 ^a | 1.09 ± 0.04 ^{bc} | 1.17 ± 0.01 ^{ab} | 1.17 ± 0.02 ^{ab} |
| Crude fiber | 36.89 ± 0.05 ^a | 33.02 ± 0.41 ^b | 28.74 ± 0.10 ^c | 24.38 ± 0.61 ^d | 25.49 ± 0.34 ^d |
| Nitrogen free extract | 26.45 ± 0.07 ^d | 31.04 ± 0.43 ^c | 35.39 ± 0.12 ^b | 37.63 ± 0.66 ^a | 37.44 ± 0.41 ^a |
| Physicochemical properties | | | | | |
| pH | 5.61 ± 0.01 ^c | 6.84 ± 0.01 ^b | 6.95 ± 0.01 ^a | 5.34 ± 0.02 ^d | 5.27 ± 0.00 ^e |
| Water solubility (%) | 5.78 ± 0.58 ^b | 8.69 ± 0.62 ^a | 6.09 ± 0.30 ^b | 5.50 ± 0.53 ^b | 5.19 ± 0.16 ^b |
| Relative crystallinity (%)* | 5.66 | 3.93 | 4.40 | 5.16 | 5.63 |

* Relative crystallinity was calculated from only one sample.

Values with different superscripts in the same row indicate significant difference ($p < 0.05$).

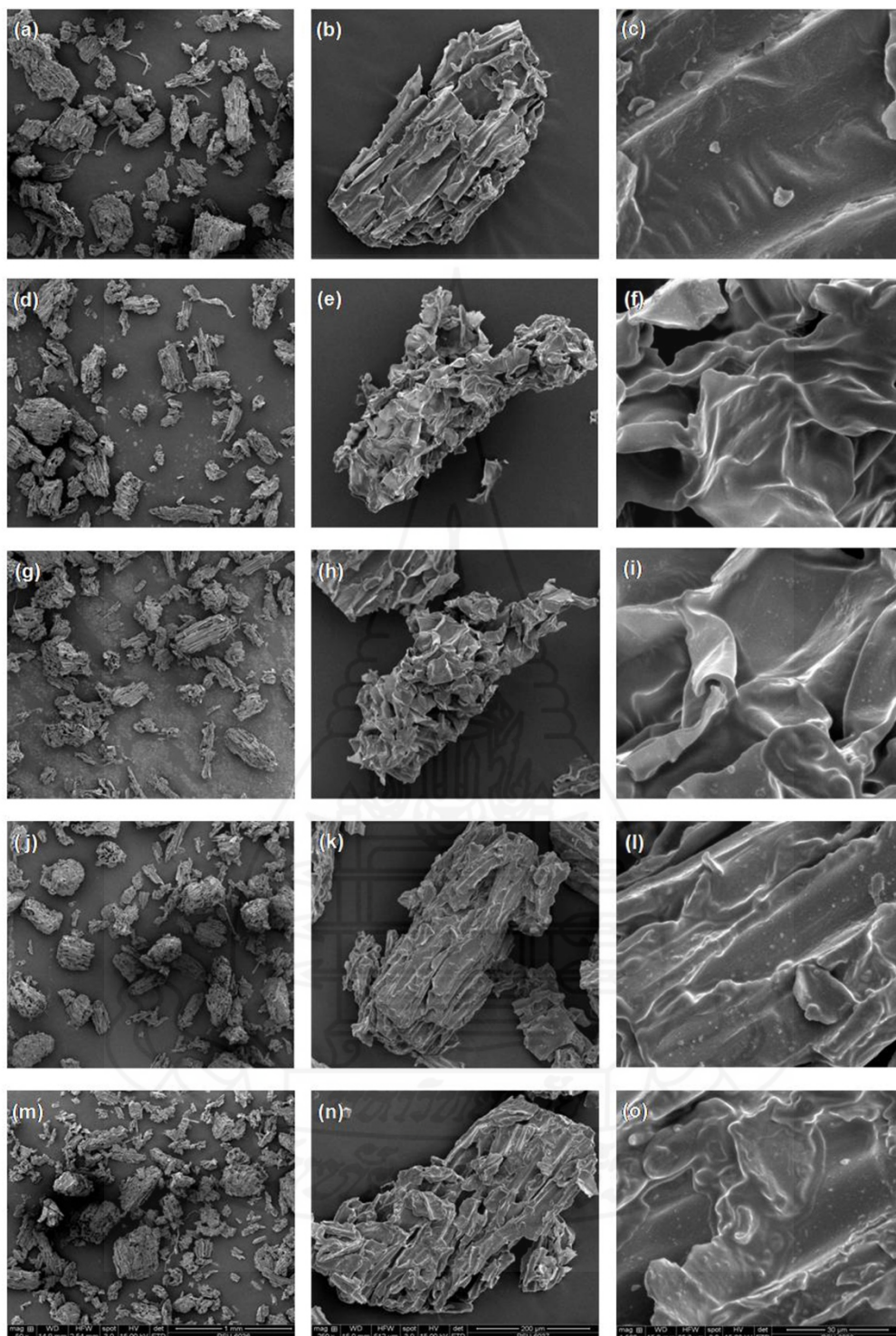


Fig. 1 Microstructures of raw (a–c) and modified CM samples: water soaking (d–f), microwave irradiation (g–i), gamma irradiation (j–l), and electron beam (m–o). Magnifications of photographs were recorded at 50 \times (left panel), 250 \times (middle panel) and 1500 \times (right panel).

Diffraction patterns

The diffraction patterns of the control and modified CM samples were similar (Fig. 2). The main peaks were found at diffraction angles of 15.9° , 20.1° , 23.6° and 25.2° (2θ). The calculated relative crystallinity (RC) significantly decreased in the water-soaked (3.93% RC), microwave-irradiated (4.40% RC) and gamma-irradiated (5.16% RC) CM samples whereas similar values were found in the unmodified (5.66% RC) and electron beam-irradiated (5.63) CM samples (Table 1).

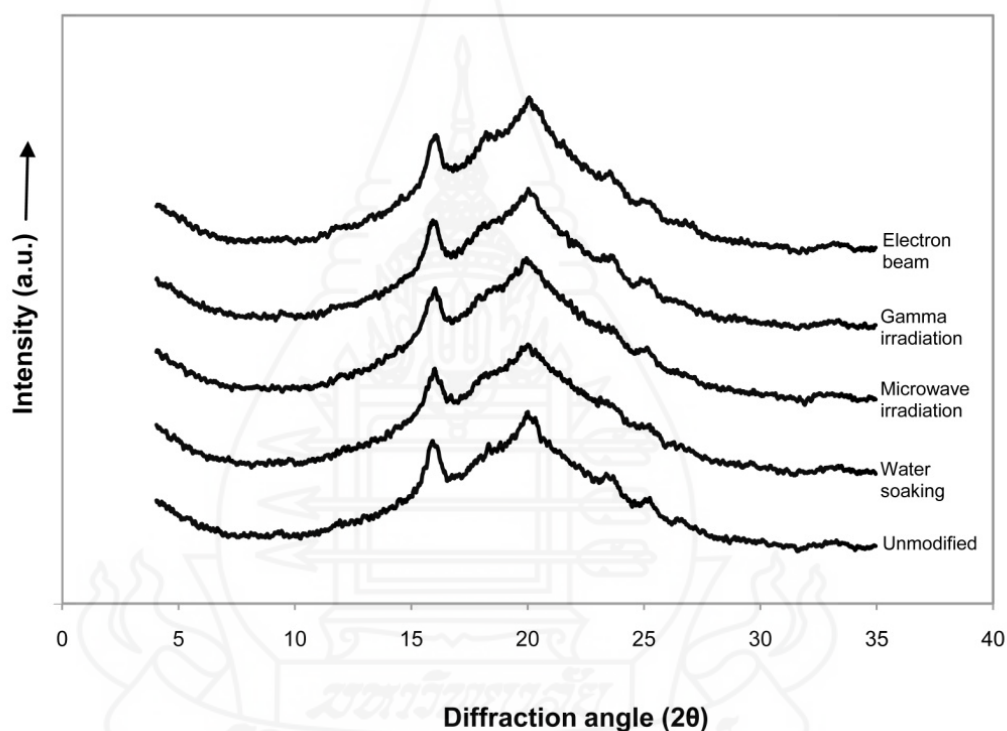


Fig. 2 Diffractograms of CM samples modified by different physical methods. Diffraction patterns were detected between 4° and 35° (2θ).

Thermal properties

Differences in transition temperatures (T_o , T_p and T_c), melting temperature range ($T_c - T_o$), enthalpy (ΔH) and the degree of gelatinization (DG) were observed in the CM samples modified by different methods (Table 2). Notable changes in thermograms were detected within a temperature range of 46.5 – 152.2°C . The gamma-irradiated and electron beam-irradiated CM samples had higher transition temperatures whereas the water-soaked and microwave-irradiated

CM samples had higher T_o but lower T_p and T_c , when compared with the control sample. The melting temperature range was broader after gamma irradiation, and was narrower after modification by the other methods, when compared with the control sample. The ΔH of the modified CM samples had lower values than in the control sample. The highest DG value was observed in the water-soaked CM, followed by that modified by electron beam, gamma and microwave irradiation, respectively.

Table 2 Thermal transition properties of raw and modified CMs observed from DSC thermograms.

| Thermal parameter | Unmodified | Water soaking | Microwave irradiation | Gamma irradiation | Electron beam |
|-------------------|------------|------------------|--------------------------|----------------------|------------------|
| T_o (°C) | 46.47 | 54.10 | 47.85 | 61.23 | 59.17 |
| T_p (°C) | 82.83 | 81.67 | 80.25 | 97.25 | 89.17 |
| T_c (°C) | 119.68 | 110.93 | 113.87 | 152.17 | 125.92 |
| $T_c - T_o$ (°C) | 73.21 | 56.83 | 66.02 | 90.94 | 66.75 |
| ΔH (J/g) | 95.73 | 46.72 | 67.94 | 60.24 | 48.97 |
| DG (%)* | 0.00 | 51.19 | 29.02 | 37.07 | 48.84 |

T_o = onset temperature, T_p = peak temperature, T_c = conclusion temperature, $T_c - T_o$ = melting temperature range, ΔH = enthalpy

* Degree of gelatinization (DG, %) was calculated from $(1 - \frac{\Delta H \text{ of modified CM}}{\Delta H \text{ of unmodified CM}}) \times 100$

***In vitro* carbohydrate digestibility**

The method of modification had some effect on the carbohydrate digestibility in both fish species. Soaking and microwave irradiation produced significantly increased digestibility in Nile tilapia, as did, to a lower degree, irradiation by electron beam, when compared with the control sample ($p < 0.05$, Fig. 3a). No significant changes in digestibility were found in any of the treatments for silver barb ($p > 0.05$, Fig. 3b). However, relatively higher levels of digestibility were obtained after modification by water soaking and microwave irradiation.

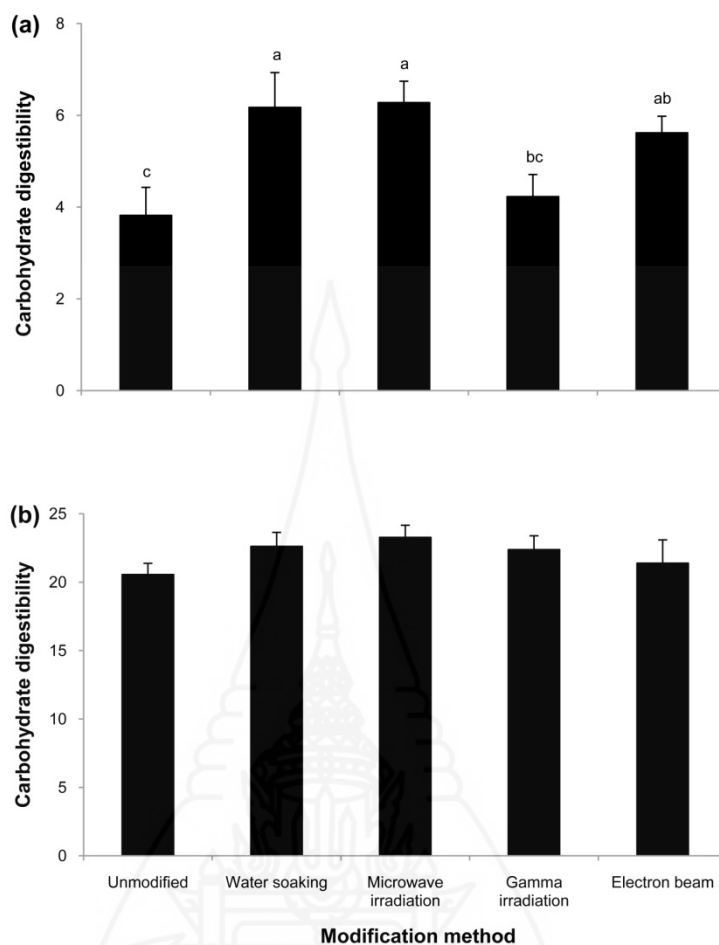


Fig. 3 *In vitro* carbohydrate digestibility (μmol maltose/g) of raw and modified CM samples, using digestive enzyme extracts (amylase activity = 1000 U) from Nile tilapia (a) and silver barb (b). Data with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

DISCUSSION

Chemical composition of CM samples

The protein contents were unchanged after modification by water soaking, microwave irradiation and gamma irradiation and this finding is in agreement with earlier research using gamma and microwave-irradiated fish feed mixtures¹², and gamma-irradiated soy flour¹³. This indicates that the three modification processes had no effect on the quantity of protein. The increased lipid content after gamma irradiation probably arises as a result of the transformation of unsaturated fatty acids into saturated fatty acids, which is a normal factor affecting lipid rancidity. On the other hand, decreased lipid content in the CM might be due to the peroxidation of saturated fatty

acids, providing hydroperoxides and other secondary oxidation products. This interpretation correlates with the decreased polyunsaturated fatty acids found after feed mixtures were exposed to microwave irradiation ¹⁴. The significant increase in ash content might be due to a chelating reaction induced by soaking in water and irradiation by microwaves and electron beam.

Decreased fiber after modification has previously been reported in gamma-irradiated wheat straw, cotton seed shell, peanut shell, soybean shell, extracted olive cake and extracted unpeeled sunflower seeds ¹⁵, and pretreated, delignified and steam-exploded rice straws ¹⁶. This decrease occurred concurrently with a significant increase in available carbohydrate. Both findings indicate that modification may destroy physical barriers, which in CM would probably be lignocellulosic constituents. Therefore, the results found in this study may indicate that there is more available carbohydrate in modified CMs than in unmodified material.

Physicochemical properties of CMs

The increased pH in the water-soaked and microwave-irradiated CM samples might have arisen as a result of the release of hydroxyl groups from lignocellulosic degradation. On the other hand, decreased pH values in the CM samples modified with ionizing radiations (gamma and electron beam irradiation), are probably due to the breakdown of starch molecules due to the action of free radicals, inducing the formation of carboxyl groups. This tendency has been similarly reported in gamma-irradiated corn ¹⁷ and potato and bean starches ¹⁸. Water solubility is an important characteristic governing the hydrolytic properties of feedstuff due to digestive enzymes ¹². Significantly increased solubility after soaking suggests that the modification method may improve this property in CM.

As regards microstructure, soaking and microwave irradiation can cause an increase in the surface structure of CM. This was also observed in fish diet and wheat straw after modification ^{14, 16}. On the other hand, the smooth and denser surface found in the other treatments is similarly in accord with previous findings relating to gamma-irradiated corn and potato starches ^{17, 18}, when compared with non-treated starch.

Differences in RC and the strength of diffraction peaks were observed in water-soaked and microwave-irradiated CM samples when compared with the control sample. This suggests

that the crystalline region might be disturbed, causing an increase of the amorphous region, after the modification of the raw material. Kaur et al.¹⁹ reported a negative correlation coefficient between RC and the *in vitro* digestibility of rapidly and slowly digestible starches in Indian lentils. Therefore, a significant decrease in this parameter may cause an increase in digestible starch in CM. Moreover, Cooke and Gidley²⁰ suggested that the change of melting enthalpy primarily reflects a loss of double helical order rather than a loss of crystalline order. This suggests that the alteration in the modified CM occurs at both the double helical and crystalline levels.

With regard to melting temperature range, Bao and Corke²¹ suggested that the value might be increased directly by the heterogeneity of the starch crystallites. Therefore, the narrowness in the temperature range of the water-soaked CM is probably due to the homogeneity in the cleaved length of amylose and amylopectin chains after modification. Decreased melting enthalpy probably contributes to partial gelatinization of starch during processing⁷. Therefore, the lowering of the enthalpy in this study was sufficient to gelatinize the soaked CM, leading to the higher DG. This characteristic is important for improving the carbohydrate digestibility in feedstuffs¹².

***In vitro* carbohydrate digestibility of CM**

The increased carbohydrate digestibility was correlated with the observed physicochemical properties as described above. However, digestibility also depends on other properties of starch, such as its particle diameter and amylose content¹⁹. Although microwave irradiation improved the digestibility in fish, this method requires high energy and equipment costs as compared to soaking in water, which produced similar digestibility. Moreover, some anti-nutritional compounds i.e. polyphenol, tannin, phytic acid and α -amylase inhibitor can be reduced by soaking pretreatment^{22, 23}. The increased carbohydrate digestibility after soaking in water found in this study is in agreement with previous findings in moth beans, black grams and chick peas^{24, 25}. Moreover, in an *in vivo* experiment, Hossain et al.²⁶ reported that a supplementation of soaked Sesbania seeds in the diet of common carp (*Cyprinus carpio*) improved growth performance and feed utilization, and Sotolu and Faturoti²⁷, reported a similar finding relating to the use of soaked leucaena seed in African catfish (*Clarias gariepinus*).

CONCLUSIONS

The method of modification had significant effects in respect of decreasing the crude fiber level and increasing the available carbohydrate. The physicochemical properties of water-soaked CM changed, with an increased pH value and water solubility and a curved and folding microstructure leading to an increasing surface area. There was also a decrease in crystallinity, and altered thermal properties, with reduced melting enthalpy but an increased degree of gelatinization. These results indicate that this method of modification is effective in increasing amorphous structure, thus enhancing enzymatic hydrolysis and promoting better feedstuff utilization in animals. The study of *in vitro* digestibility indicates that water soaking increased carbohydrate digestion in both fish species. Therefore, the preparation of CM by soaking in water is an appropriate method to enable its use as an *aqua feedstuff*.

Acknowledgements: This research was partially supported by a grant from the Office of Graduate Studies, Sukhothai Thammathirat Open University, Nonthaburi, Thailand. We acknowledge the Institute of Nuclear Technology (Public Organization) for kindly preparing the irradiated CM samples; and the Scientific Equipment Center, Prince of Songkla University, for help in sample analysis. The authors would like to thank the Publication Clinic, Research and Development Office, Prince of Songkla University, for help in the preparation of the manuscript.

REFERENCES

1. Swick RA (1999) Considerations in using protein meals for poultry and swine. *ASA Tech Bull AN21*, 1–11.
2. Balasubramaniam K (1976) Polysaccharides of the kernel of the maturing and mature coconuts. *J Food Sci* **41**, 1370–3.
3. Olude OO, Alegbeleye WOA, Obasa SO (2008) The use of soaked copra meal as a partial substitute for soybean meal in the diet of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Liv Res Rural Dev* **20(10)**, Article 169.
4. Khatoon N, Prakash J (2006) Nutrient retention in microwave cooked germinated legumes. *Food Chem* **97**, 115–21.

5. Sadeghi AA, Shawrang P (2006) Effects of microwave irradiation on ruminal protein and starch degradation of corn grain. *Anim Feed Sci Technol* **127**, 113–23.
6. Ebrahimi SR, Nikkhah A, Sadeghi AA, Raisali G (2009) Chemical composition, secondary compounds, ruminal degradation and *in vitro* crude protein digestibility of gamma irradiated canola seed. *Anim Feed Sci Technol* **151**, 184–93.
7. Chung HJ, Lee SY, Kim JH, Lee JW, Byun MW, Lim ST (2010) Pasting characteristics and *in vitro* digestibility of γ -irradiated RS₄ waxy maize starches. *J Cereal Sci* **52**, 53–8.
8. Bak JS, Ko JK, Han YH, Lee BC, Choi IG, Kim KH (2009) Improved enzymatic hydrolysis yield of rice straw using electron beam irradiation pretreatment. *Biores Technol* **100**, 1285–90.
9. Shawrang P, Sadeghi AA, Behgar M, Zareshahi M, Shahhoseini G (2011) Study of chemical compositions, anti-nutritional contents and digestibility of electron beam irradiated sorghum grains. *Food Chem* **125**, 376–9.
10. AOAC (2005) *Official Methods of Analysis*, 18th edn, Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
11. Sokhey AS, Chinnaswamy R (1993) Chemical and molecular properties of irradiated starch extrudates. *Cereal Chem* **70**(3), 260–8.
12. Thongprajukaew K, Kovitvadhi U, Kovitvadhi S, Somsueb P, Rungruangsak-Torrissen K (2011) Effects of different modified diets on growth, digestive enzyme activities and muscle compositions in juvenile Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). *Aquaculture* **322–323**, 1–9.
13. Hamza RG, Afifi S, Abdel-Ghaffar ARB, Borai IH (2012) Effect of gamma irradiation or/and extrusion on the nutritional value of soy flour. *Biochem Anal Biochem* **1**(6), 1–6.
14. Thongprajukaew K (2011) Feed development using digestive enzyme technology for successive growth in Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). PhD thesis, Kasetsart Univ, Bangkok, Thailand.
15. Al-Masri MR, Guenther KD (1999) Changes in digestibility and cell-wall constituents of some agricultural by-products due to gamma irradiation and urea treatments. *Radiat Phys Chem* **55**, 323–9.
16. Kristensen JB, Thygesen LG, Felby C, Jørgensen H, Elder T (2008) Cell-wall structural changes in wheat straw pretreated for bioethanol production. *Biotechnol Biofuels* **1**, 5–14.

17. Chung HJ, Liu Q (2009) Effect of gamma irradiation on molecular structure and physicochemical properties of corn starch. *J Food Sci* **74**, 353–61.
18. Chung HJ, Liu Q (2010) Molecular structure and physicochemical properties of potato and bean starches as affected by gamma-irradiation. *Int J Biol Macromol* **47**, 214–22.
19. Kaur M, Sandhu KS, Lim ST (2010) Microstructure, physicochemical properties and *in vitro* digestibility of starches from different Indian lentil (*Lens culinaris*) cultivars. *Carbohydr Polym* **79**, 349–55.
20. Cooke D, Gidley MJ (1992) Loss of crystalline and molecular order during starch gelatinization: origin of the enthalpic transition. *Carbohydr Res* **227**, 103–12.
21. Bao J, Corke H (2002) Pasting properties of γ -irradiated rice starches as affected by pH. *J Agricult Food Chem* **50**, 336–41.
22. Vijayakumari K, Pugalenti M, Vadivel V (2007) Effect of soaking and hydrothermal processing methods on the levels of antinutrients and *in vitro* protein digestibility of *Bauhinia purpurea* L. seeds. *Food Chem* **103**, 968–75.
23. Khandelwal S, Udipi SA, Ghugre P (2010) Polyphenols and tannins in Indian pulses: Effect of soaking, germination and pressure cooking. *Food Res Int* **43**, 526–30.
24. Negi A, Boora P, Khetarpaul N (2001) Effect of microwave cooking on the starch and protein digestibility of some newly released moth bean (*Phaseolus aconitifolius* Jacq.) cultivars. *J Food Comp Anal* **14**, 541–6.
25. Rehman ZU (2007) Domestic processing effects on available carbohydrate content and starch digestibility of black grams (*Vigna mungo*) and chick peas (*Cicer arietium*). *Food Chem* **100**, 764–7.
26. Hossain MA, Focken U, Becker K (2001) Effect of soaking and soaking followed by autoclaving of Sesbania seeds on growth and feed utilisation in common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture* **203**, 133–48.
27. Sotolu AO, Faturoti EO (2008) Digestibility and nutritional values of differently processed *Leucaena leucocephala* (Lam. de Wit) seed meals in the diet of African catfish (*Clarias gariepinus*). *Middle-East J Sci Res* **3(4)**, 190–9.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1 Microstructures of raw (a–c) and modified CM samples: water soaking (d–f), microwave irradiation (g–i), gamma irradiation (j–l), and electron beam (m–o). Magnifications of photographs were recorded at 50× (left panel), 250× (middle panel) and 1500× (right panel).

Fig. 2 Diffractograms of CM samples modified by different physical methods. Diffraction patterns were detected between 4° and 35° (2 θ).

Fig. 3 *In vitro* carbohydrate digestibility (μmol maltose/g) of raw and modified CM samples, using digestive enzyme extracts (amylase activity = 1000 U) from Nile tilapia (a) and silver barb (b). Data with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

